

植物糖転移酵素を用いた機能性化合物の糖鎖構築

水上 元†

Sugar Chain Construction of Functional Natural Products Using Plant Glucosyltransferases

Hajime Mizukami†

Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University;
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

(Received April 5, 2015)

Plant secondary product glucosyltransferases belong to family 1 of the glucosyltransferase superfamily and mediate the transfer of a glucosyl residue from activated nucleotide sugars to lipophilic small molecules, thus affecting the solubility, stability and pharmacological activities of the sugar-accepting compounds. The biotechnological application of plant glucosyltransferases in glycoside synthesis has attracted attention because enzymatic glycosylation offers several advantages over chemical methods, including (1) avoiding the use of harsh conditions and toxic catalysts, (2) providing strict control of regio- and stereo-selectivity and (3) high efficiency. This review describes the *in vivo* and *in vitro* glycosylation of natural organic compounds using glucosyltransferases, focusing on our investigation of enzymatic synthesis of curcumin glycosides. Our current efforts toward functional characterization of some glucosyltransferases involved in the biosynthesis of iridoids and crocin, as well as in the sugar chain elongation of quercetin glucosides, are described. Finally, I describe the relationship of the structure of sugar chains and the intestinal absorption which was investigated using chemoenzymatically synthesized quercetin glycosides.

Key words—chemoenzymatic glucosylation; natural product; functional characterization; plant secondary metabolism glucosyltransferase

1. はじめに

高等植物は構造的に多種多様な二次代謝化合物を生産し、蓄積している。これらの二次代謝産物の多くは、医薬品、香料、色素などとして用いられている。二次代謝産物の構造多様性は、1つにはその基本骨格の多様性に起因しているが、基本骨格に対する水酸化、アシル化、メチル化、配糖化などの修飾反応も構造多様性を生み出す重要な要因である。共通の基本骨格に対して修飾を施すことにより構造多様性を生み出すという戦略は、限定された資源（ゲノム中の遺伝子や原料となる有機化合物の数など）のもとに、膨大な数の二次代謝産物を生み出すために、植物が進化の中で獲得してきた能力であると考えられる。¹⁾ 例えば、フラボノイドにみられる共通

の芳香環構造に対する様々な修飾反応の結果として生じ得る化合物は理論的には 38600 以上にのぼり、実際に 7000 種類以上のフラボノイド化合物がこれまでに報告されているという。²⁾

高等植物における二次代謝産物の修飾反応としての配糖化は、plant secondary product glucosyltransferases (PSPG) と総称される糖転移酵素によって触媒されている。PSPG は、97 の family からなる糖転移酵素 superfamily³⁾ の family 1 (GT1) に属し、生合成中間産物だけでなく外来性異物を含む様々な低分子有機化合物をアクセプター基質とし、糖供与体 (UDP-activated sugar) から様々な糖分子を転移する反応を触媒する酵素である。PSPG による糖転移反応は、様々な糖が供与体基質となり得ること、アクセプター基質の酸素原子だけでなく、炭素原子、窒素原子、硫黄原子にも糖を結合し得ること、糖は単独でアクセプター基質に結合して monoglycosides を生成するだけでなく、monoglycoside 中の糖残基にさらに糖分子を結合させて oligoglycosides を生成することなどから、二

名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野 (〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

現所属：†高知県立牧野植物園 (〒781-8125 高知市五台山 4200-6)

e-mail: hajimem@makino.or.jp

本総説は、平成 25 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

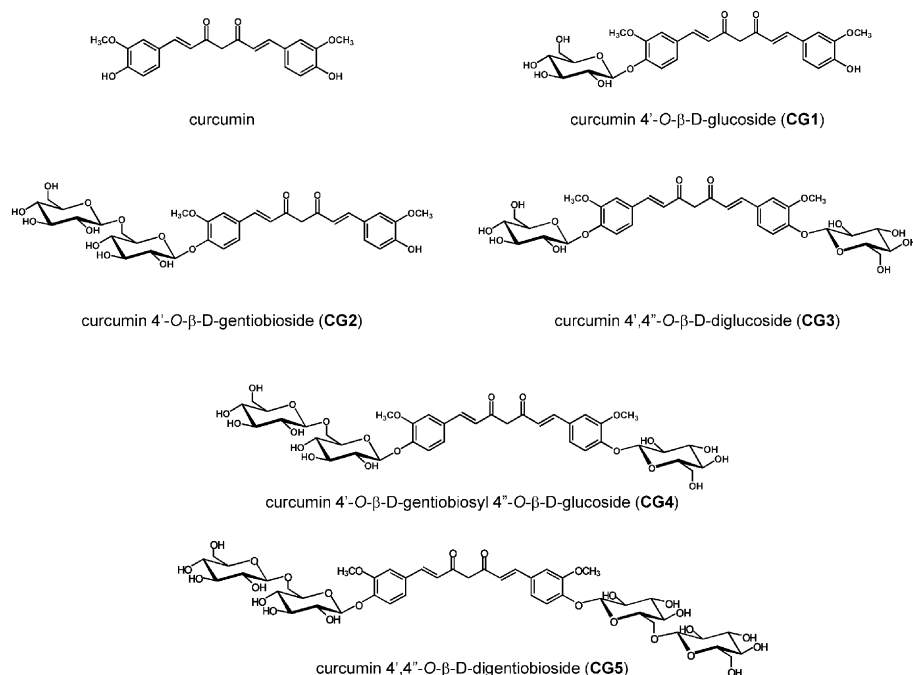


Fig. 1. Structures of Curcumin and Its Glucosylation Products

次代謝産物の多様性を生み出す上で最も重要な役割を果たしている。⁴⁾ 実際に、**quercetin** という 1 個のアグリコンに対して 300 種類の異なった配糖体が知られているという。²⁾

低分子有機化合物の配糖化は、水溶性の増大（糖の種類にもよるが）や安定性の増大、毒性の低減、生物学的活性や体内動態の変化が期待できるために、薬学的な観点からも重要な課題である。配糖体の化学合成は、多段階の保護／脱保護プロセスが必要のために、一般に手間を要し、収量も高くない。これに対して、配糖体の酵素合成は、過酷な反応環境や毒性を有する化学試薬を用いる必要がないこと、厳格な位置特異性や立体特異性の制御が可能であること、効率が高いことなどの利点を有しており、⁵⁾ **PSPG** は配糖体合成の生触媒として有用であると考えられている。⁶⁾

2. 植物の二次代謝機能を利用した **curcumin** の配糖化

2-1. 培養細胞による **curcumin** 配糖体の生産

Curcumin は香辛料として用いられる **turmeric**（ショウガ科植物ウコン *Curcuma longa* の根茎）の黄色色素成分で、植物由来機能性化合物として最も有名なものの 1 つであり、⁷⁾ 抗腫瘍活性を始め抗炎症、抗動脈硬化など様々な活性が報告されてい

る。^{8,9)} しかしながら **curcumin** の水溶性は非常に低く、経口的に摂取しても消化管で吸収されることなく、大部分はそのまま体外に排出されるものと考えられる。¹⁰⁾ そこで、水溶性 **curcumin** 誘導体の生産を目的として、まず培養細胞による **curcumin** の配糖化研究に着手した。

培養植物細胞による外来性化合物の配糖化に関する研究は 1970 年代から始まり、¹¹⁾ **hydroquinone**,¹²⁾ **vanillin**,¹³⁾ **capsaicin**¹⁴⁾ など様々な化合物について効率的な配糖体生産法が開発されている。これらの研究にならって、種々の植物種由来の懸濁培養細胞を用いて **curcumin** の配糖化を検討したところ、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*, キョウチクトウ科) の培養細胞が **curcumin** をより極性の高い化合物に変換することが明らかになった。そこで、変換産物を単離して、構造決定を行った結果、5 種の



水上 元

1949 年 3 月 29 日生。1971 年京都大学薬学部卒業、1977 年同大学大学院薬学研究科博士課程修了。テキサス A & M 大学博士研究員、長崎大学薬学部助手、名古屋市立大学薬学部助教授を経て、2002 年同大学大学院薬学研究科教授。2014 年定年退職。同年高知県立牧野植物園園長。専門：薬用植物学、生薬学。

Table 1. Water Solubility of Curcumin and Curcumin Glucosides

Compound	Numbers of glucose residues	Water solubility	
		$\mu\text{mol/mL}$	fold
Curcumin	0	3.0×10^{-5}	1
CG1	1	7.0×10^{-3}	2.3×10^2
CG2	2	7.3×10^1	2.4×10^6
CG3	2	3.7×10^2	1.2×10^7
CG4	3	4.5×10^2	1.5×10^7
CG5	4	6.5×10^2	2.2×10^7

curcumin 配糖体 (CG1–CG5) を配糖化産物として同定した (Fig. 1). これらの配糖体の水溶性を測定したところ, curcumin monoglucoside (CG1) では curcumin と比較して約 200 倍に増加したに過ぎないが, glucose 分子が 2 個結合した curcumin gentiobioside (CG2) 及び curcumin diglucoside (CG3) では約 200 万倍に増加しており, glucose 分子が 4 個結合した curcumin digentiobioside (CG5) では, その水溶性は curcumin の 2000 万倍に達した (Table 1).¹⁵⁾ これらのことは, グルコース配糖体化することは curcumin の水溶性増加の極めて有効な手段であることを示している. また, アルカリ水溶液中での安定性も curcumin diglucoside では curcumin と比較して顕著に増加した. 一方, curcumin 配糖体の抗酸化活性は, 予想通り curcumin monoglucoside では約 50% に低下し, curcumin diglucoside では消失した. しかし, これらの配糖体は消化管中で加水分解されて curcumin として体内に吸収されるために, 配糖体での抗酸化活性の低下は体内での活性発現には問題とならない.

ニチニチソウ培養細胞の curcumin 配糖化活性は増殖初期の細胞で高く, 培地 sucrose 濃度を上昇させたり, 特に methyl jasmonate を添加することによって増加するが, それでもその生産能は新鮮細胞 1 g あたり配糖体総量として $2.5 \mu\text{mol}$ 程度に過ぎなかった.¹⁵⁾ そこで, curcumin の配糖体化反応を触媒する PSPG の cDNA をニチニチソウ培養細胞からクローニングし, 組換え酵素による配糖体生産を検討することとした.

2-2. 組換え酵素による curcumin 配糖体の生産

PSPG は, C-末端領域に UDP-sugar の結合領域である高度保存領域 (PSPG-Box) を有している.¹⁶⁾ そこで, この領域に基づいて作製した degenerate

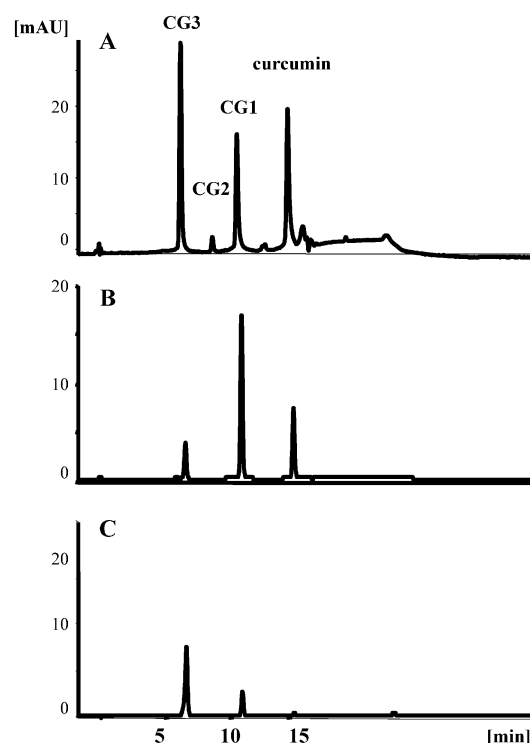


Fig. 2. Glucosylation of Curcumin by Recombinant CaUGT2 (A) HPLC chromatogram of the standard compounds. CG1, curcumin monoglucoside; CG2, curcumin gentiobioside; CG3, curcumin diglucoside. (B) Curcumin was incubated with UDP-glucose and CaUGT2 for 10 min. (C) CG1 was incubated with UDP-glucose and CaUGT2 for 10 min. Elution was monitored at 423 nm.

primer を用いて 5'-RACE, 3'-RACE を行うことにより, ニチニチソウ培養細胞から 5 種の糖転移酵素遺伝子の cDNA (CaUGT1–CaUGT5) を単離し, これらが大腸菌で発現させて得た組換え酵素の活性をスクリーニングした. まず, 基質として curcumin と UDP-glucose を用いて反応を行うと, 酵素として CaUGT2 を用いたときに経時的に CG1 と CG3 を生じた [Fig. 2(B)]. 基質として curcumin の代わりに CG1 を用いると, CG2 の生成は認められず, CG3 のみを生じた [Fig. 2(C)]. これらのことから CaUGT2 は, curcumin の 2 つのフェノール性水酸基に glucose を抱合する反応を触媒する酵素であることがわかった. CaUGT2 の配糖化反応は curcumin に特異的ではなく, esculetin などの coumarins や 4-nitrophenol のような単純な phenolics に対しても触媒活性を示すので, おそらく細胞内では異物処理に関与しているのではないかと推定している.¹⁷⁾

これに対して, CaUGT3 は, アクセプター基質として curcumin を用いても配糖体は全く生成しな

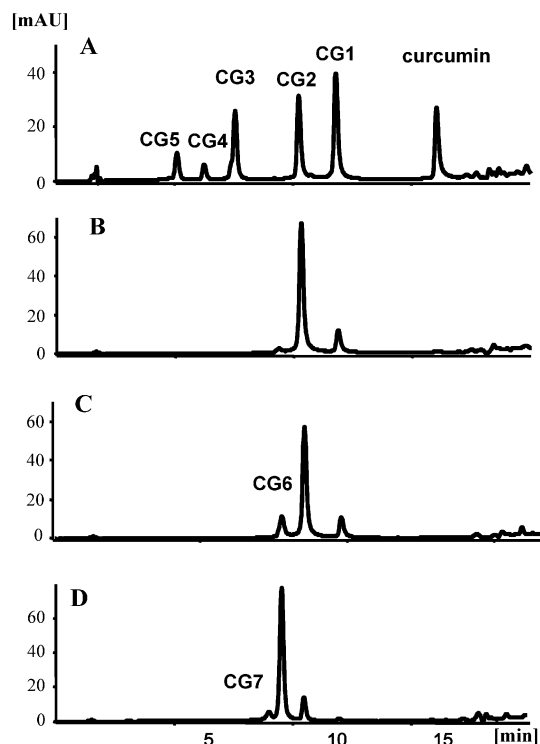


Fig. 3. Glucosylation of Curcumin Monoglucoside by Recombinant CaUGT3

(A) HPLC chromatogram of the standard compounds. CG1, curcumin monoglucoside; CG2, curcumin gentiobioside; CG3 curcumin diglucoside; CG4, curcumin glucosyl gentiobioside; CG5, curcumin digentiobioside. CG1 was incubated with UDP-glucose and CaUGT3 for 10 min (B), and 60 min (C). (D) CG1 was incubated with increased amounts of UDP-glucose and the recombinant protein for 120 min. Elution was monitored at 423 nm. CG6 and CG7 were identified as curcumin gentiotrioside and curcumin gentiotetroside, respectively.

いが、CG1 を反応系に添加すると効率よく CG2 に転換したことから、CG1 の糖鎖の glucose に対して 1,6-glucosyltransferase 活性を有する糖鎖伸長酵素であることが明らかになった [Figs. 3(B) and (C)]. CaUGT3 の酵素量や UDP-glucose の基質濃度を増やすと、curcumin gentiotrioside (CG6) や curcumin gentiotetroside (CG7) の生成も認められ [Fig. 3(D)], CaUGT3 は glucose 残基を直鎖的に伸長する活性を持つことが示された。CaUGT3 は、種々の quercetin 3-*O*-glucoside や luteolin 7-*O*-glucoside などに対しても CG1 に対するのと同程度の 1,6-glucosyltransferase 活性を示すことから、ニチニチソウの細胞内ではむしろ flavonoid *O*-glucoside に対する糖鎖伸長酵素として機能しているのではないかと考えられた。¹⁸⁾ CaUGT4 も CG1 に対して糖鎖伸長活性を示したが、その活性は CaUGT3 に比較すると極めて弱かった。これらのことから、ニチニチソウ培養細胞における curcumin の配糖化反応は、

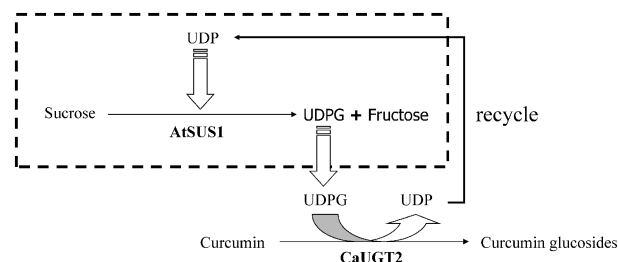


Fig. 4. General Concept of a One-pot Two-enzyme System for Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Curcumin Glucosides

CaUGT2 及び CaUGT3 の 2 つの酵素によって担われていることが明らかになった。

PSPG は UGT 命名委員会によって確立されたアミノ酸配列の類似性を基礎としたシステムによって命名することが推奨されている。¹⁹⁾ このシステムに基づくと CaUGT2 は UGT73A15, CaUGT3 は UGT94E3 と命名される。

2-3. *In situ* UDP-glucose recycling による curcumin 配糖体の効率的酵素合成 Curcumin 配糖体の化学合成についてはこれまでに、curcumin に acetobromoglucose を縮合させる方法²⁰⁾と vanillin を出発物質とする全合成法²¹⁾の 2 つの方法が報告されている。いずれの方法を用いた場合でも最終産物は CG1 及び CG3 の混合物であり、その収率は両者を合わせて 10–30% に過ぎない。これに対して CaUGT2 を用いる酵素合成法は極めて簡単で、ほぼ定量的に CG3 に転換することが可能である。酵素合成法の欠点は、糖供与体基質である UDP-glucose が比較的高価であることと、反応生成物の 1 つである UDP が酵素反応を阻害するために、反応の進行に伴って反応速度が低下するという点にある。²²⁾ このために、UDP-glucose をより安価な材料から合成する酵素反応を配糖化反応とカップリングさせるという手法²³⁾が検討されてきたが、このようなアプローチでは UDP-glucose の供給という問題はある程度解決できても、反応産物である UDP による反応阻害という問題は解決できない。

植物は UDP-glucose を生体反応のエネルギー源として利用しており、必要に応じて貯蔵物質である sucrose から UDP-glucose を産生する代謝経路を有している。²⁴⁾ この反応を触媒する sucrose synthase を用いて、PSPG による配糖体生産反応系からの UDP の除去と UDP-glucose のリサイクルを同時に

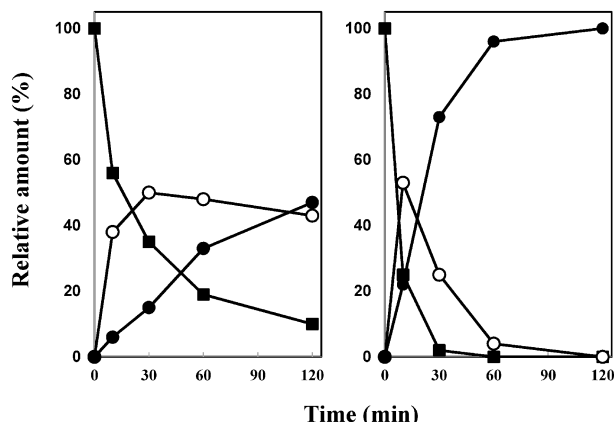


Fig. 5. Glucosylation of Curcumin Catalyzed by CaUGT2 with or without AtSUS1

Assays were carried out at 30°C in the assay buffer (pH 7.5) containing 0.3 M sucrose (left) or 0.3 M sucrose and AtSUS1 (right). Filled squares, curcumin, open circles, curcumin monoglucoside (CG1); filled circles, curcumin diglucoside (CG3).

行う one-pot two-enzyme system を構築した (Fig. 4).²⁵⁾

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, アブラナ科) の sucrose synthase 1 (AtSUS1)²⁶⁾ の cDNA を単離し, 大腸菌発現系を用いて調製した組換え酵素 (AtSUS1) を sucrose とともに CaUGT2 による

curcumin 配糖化系に添加して配糖体生産を追跡した. CaUGT2 単独では 60 分間の反応で最終反応産物の CG3 まで配糖化されたものは約 30% に過ぎず, 基質である curcumin の約 20% が反応液中に残存していたが, AtSUS1/sucrose を共存させると基質のほぼ 100% が CG3 に転換された (Fig. 5). この方法は UDP-glucose を基質とする PSPG を用いた酵素合成に一般的に適用できるだけでなく, UDP-rhamnose や UDP-glucuronic acid を糖供与基質とする糖転移酵素による配糖化反応においても, 反応系から阻害物質である UDP を除去するという点で有効であると考えられる.

シロイヌナズナからクローニングされた UGT71C3 は, quercetin などの flavonol の 3 位の水酸基を特異的に配糖化する flavonol 3-*O*-glucosyltransferase であることが報告されている.²⁷⁾ ところが, AtSUS1/sucrose 共存下では, quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin, QG1) に加えて quercetin 3,4'-*O*-diglucoside (QG2) と quercetin 3,7-*O*-diglucoside (QG3) が配糖化産物として検出される (Fig. 6) ことから, UGT71C3 は阻害物質である UDP が蓄積する試験管内での反応から flavonol の

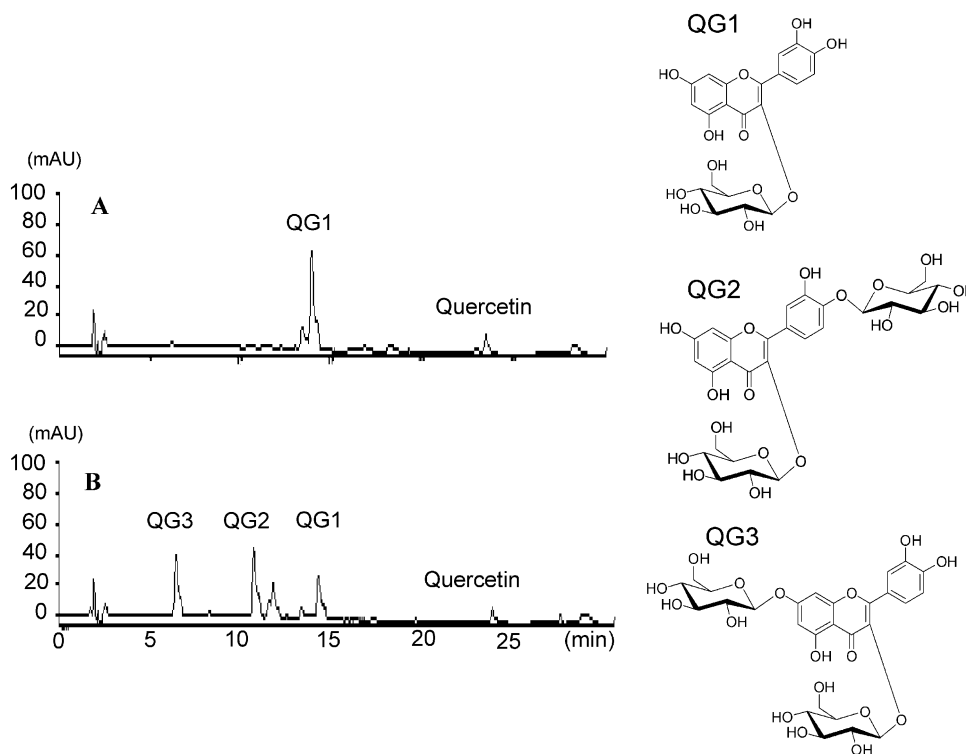


Fig. 6. Glucosylation of Quercetin by UGT71C3 with AtSUS1

Quercetin was incubated with UGT71C3 and AtSUS1 (A) in the absence or (B) in the presence of sucrose for 1 h. Elution was monitored at 340 nm.

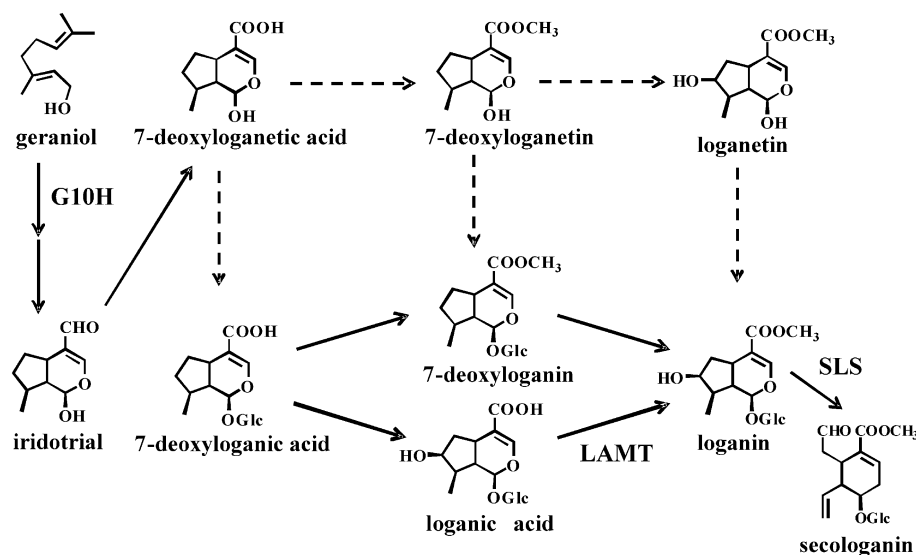


Fig. 7. A Proposed Biosynthetic Pathway Leading to Loganin and Secologanin

Dotted arrows indicate the possible step catalyzed by a glucosyltransferase. G10H, geraniol 10-hydroxylase; LAMT, loganic acid methyltransferase; SLS, secologanin synthase.

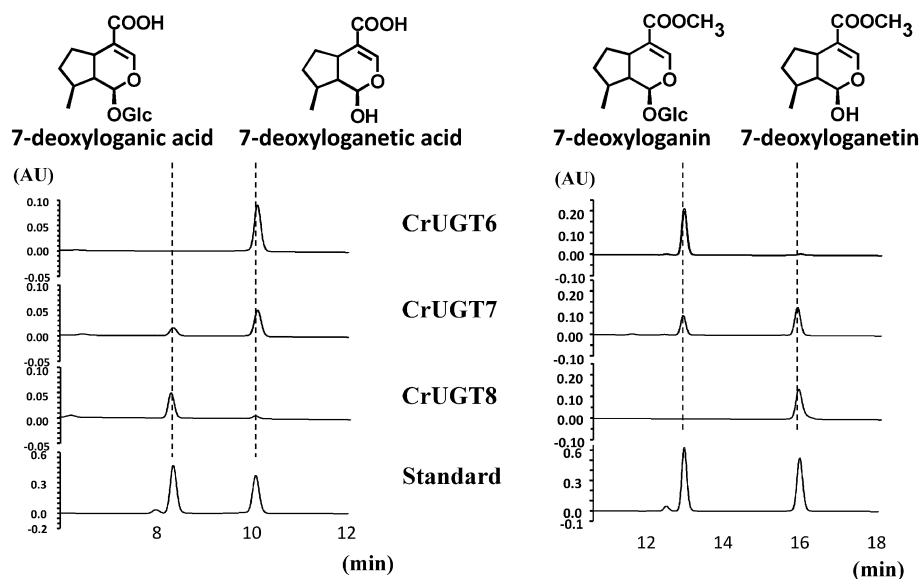


Fig. 8. Glucosylation of 7-Deoxyloganic Acid and 7-Deoxyloganetin by Recombinant CrUGT6, CrUGT7, and CrUGT8

3 位の水酸基に位置特異的な flavonol 3-O-glucosyltransferase であると機能的に同定されていたが, UDP が除去されるような細胞内の環境下では, より広範な位置特異性を示すことを示唆している.²⁸⁾ AtSUS1/sucrose を用いる one-pot two-enzyme system は PSPG を用いる配糖体の酵素合成を効率化するだけでなく, PSPG の基質特異性を解明する上でも有効なツールとなり得るものと考えられる。

3. 植物二次代謝糖転移酵素に関する基礎研究

3-1. Iridoids 生合成に係わる PSPG の単離と機能解析 Iridoids は, cyclopenta-[c]-pyran 骨格を持つ環状 monoterpenoids であり, その名前は *Iridomyrmex* 属のアリから初めて単離されたことに由来している。Iridoids は双子葉植物に広く分布し, 植物と昆虫との相互作用に関与しているものと考えられている.²⁹⁾ センブリ (*Swertia japonica*, リンドウ科) などに含まれる苦味配糖体を始め, オオバコ (*Plantago asiatica*, オオバコ科) の aucu-

Table 2. Kinetic Parameters of Three Recombinant PSPGs Isolated from Leaves of *Catharanthus roseus* toward 7-Deoxyloganic Acid and 7-Deoxyloganetin

Protein	Kinetic parameters of recombinant CrUGT6, 7 and 8					
	Kinetic parameters for 7-deoxyloganic acid			Kinetic parameters for 7-deoxyloganetin		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CrUGT6	—	—	—	0.142	0.0115	81.0
CrUGT7	61.1	0.00164	26.8	2.12	0.00520	2.45
CrUGT8	87.7	0.131	1484.1	—	—	—

bin, クチナシ (*Gardenia jasminoides*, アカネ科) の geniposide など生薬の活性成分として知られてきたものも多い。Iridoids には、最近になって神経細胞保護作用や抗がん作用、抗アレルギー作用、免疫調節作用など新たな活性が相次いで報告され、医薬品資源としても注目されている。³⁰⁾ また, secoiridoids である secologanin は monoterpene indole alkaloids (MIA)³¹⁾ や quinoline alkaloids (QA)³²⁾ の生合成前駆物質としても重要な役割を果たしている。

Iridoids の生合成は, geraniol の 10 位の水酸化を経て生じた iridotrial が基本骨格となり, メチル化, 配糖化, 水酸化などの修飾を経て生合成されることが主としてトレーサー実験の結果から推定されている (Fig. 7)。^{33,34)} しかしながら, iridoids のほとんどが 1 位の水酸基に glucose が抱合した配糖体として存在しているにもかかわらず, iridane 骨格の配糖体化が生合成のどの段階で起こるのかについては明らかになっておらず, もちろん配糖化を触媒する PSPG も明らかになっていなかった。

ニチニチソウの培養細胞から単離した 5 種の PSPG には iridoids に対する糖転移活性は全く認められなかった。ニチニチソウの培養細胞では MIA 生合成活性が非常に低いために, 新たにニチニチソウの葉から PSPG-Box の保存配列に基づく homology-based cloning を行って, 3 種の PSPG 遺伝子の cDNA をクローニングした (CrUGT6–CrUGT8)。これらの組換え酵素を用いて 7-deoxyloganic acid と 7-deoxyloganetin を基質として配糖化活性を検討した結果, CrUGT6 (UGT85A23) と CrUGT7 (UGT76A2) は 7-deoxyloganetin を配糖化して 7-deoxyloganin に, CrUGT8 (UGT709C2) は 7-deoxyloganic acid を配糖化して 7-deoxylo-

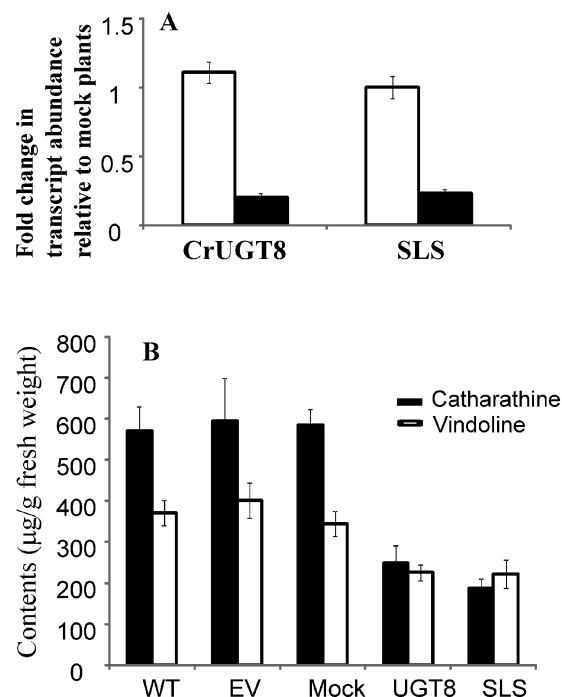


Fig. 9. Down-regulation of CrUGT8 and SLS Affects the Accumulation of MIAs in *Catharanthus roseus*

(A) Silencing of CrUGT8 and SLS was measured by monitoring relative transcript abundance of each gene by quantitative RT-PCR. Differences in transcript levels for each silenced gene were measured relative to those obtained in mock treatment. Open column, EV (empty vector)-treated plants; filled columns, VIGS-treated plants. (B) Contents of catharanthine (open columns) and vindoline (filled columns) in wild type, empty vector-treated, mock-treated, and VIGS-treated plants.

ganic acid を生成する活性を示した (Fig. 8)。そこで, 精製した酵素を用いてこれらの酵素の速度論的パラメーターを比較したところ, CrUGT6 及び CrUGT7 の 7-deoxyloganetin に対する触媒効率は CrUGT8 の 7-deoxyloganic acid に対する触媒効率の約 10% 以下だった (Table 2)。ニチニチソウに含まれる主要な MIA である catharanthine と vindoline の含量は茎長部の近くにある第 1 葉で最も高く, その下の第 2 葉, 第 3 葉の順で低くなっていくことが知られている。³⁵⁾ CrUGT6–CrUGT8 の発現量をこれらの葉で比較したところ, CrUGT8 の発現量だけがこれらの MIA の局在パターンとよく一致していた。そこで virus-induced gene silencing (VIGS) 法³⁶⁾を用いて CrUGT8 をノックダウンしたニチニチソウの植物体を作製し, その secologanin 及び vindoline, catharanthine 含量を調べたところ, 非ノックダウン体と比較して顕著に低下していた (Fig. 9)。これらの結果から, ニチニチソウにおける secologanin 生合成過程においては,

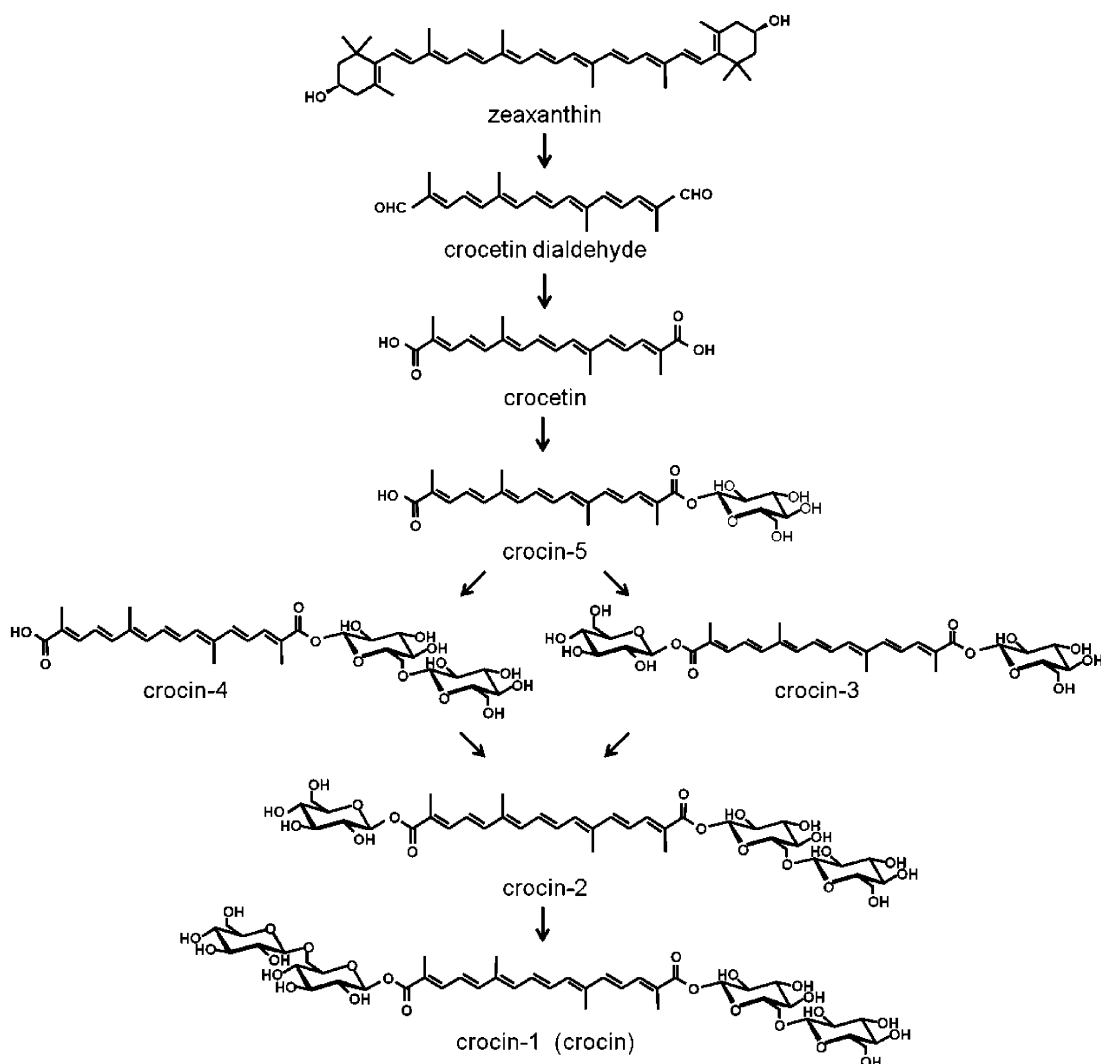


Fig. 10. A Proposed Biosynthetic Pathway Leading to Crocin

CrUGT8 が iridane 骨格の 1 位の水酸基の配糖化に関与しており、その配糖化反応の基質は 7-deoxyloganetic acid であることが明らかになった.³⁷⁾ CrUGT7 によって触媒される 7-deoxyloganetin の配糖化反応も secologanin の生合成におけるマイナーな生合成経路として機能している可能性も否定はできない。事実、クチナシ (*Gardenia jasminoides*, アカネ科) の geniposide 生合成においては、7-deoxyloganetin が配糖化反応の基質として機能している。³⁸⁾

ニチニチソウの葉における MIA 生合成の局在性についてはこれまで詳細に解析され、geraniol から 7-deoxyloganetic acid までの生合成は葉身内で柵状葉肉細胞の下にある internal phloem parenchyma (IPP) cell で行われ、7-deoxyloganic acid から

secologanin を経て MIA に至る経路は葉の表皮細胞に存在していることが明らかにされていた。³⁹⁾ 7-Deoxyloganetic acid から 7-deoxyloganic acid に至る経路の局在性は不明で、いわばミッシングリンクであった。CrUGT8 の発現の局在性を *in situ* hybridization によって調べたところ、その発現が IPP cells に局在していることが明らかになった。このことから、MIA の生合成においては、IPP 細胞で合成された 7-deoxyloganic acid が表皮細胞に移動し、表皮細胞において secologanin を経て種々の MIA に変換されることが推定できた。配糖化による水溶性の増大が、このような移動を可能にしているのかもしれない。

3-2. Crocin 生合成に関与する PSPG の単離と機能解析 Crocin は, apocarotenoids である crocetin の digentiobiosylester で, サフラン (*Crocus sativus*, アヤメ科) の柱頭部やクチナシの果実に含まれ, 水溶性の食用黄色色素として用いられるほか, 記憶学習障害の改善や血流改善などの生理活性も報告されている。⁴⁰⁾ Crocin は, xanthophyll である zeaxanthin の酸化的開裂反応を経て生じた crocetin が順次 glucose 抱合を受けることによって生成するものと考えられてきた (Fig. 10)。⁴¹⁾ 事実, サフランの柱頭やクチナシの果実には, crocetin digentiobiosylester (crocine-1) に加えて, 各種の glucose 配糖体が見い出されている。Crocin 生合成に関する酵素としては, 最近になって zeaxanthin を酸化的に開裂して crocetin dialdehyde を生成する carotenoid cleaving dioxygenase (CCD) の cDNA がサフランから単離された⁴²⁾ 以外に, 酵素や遺伝子レベルでの研究はなかった。

クチナシ培養細胞から PSPG-Box の保存配列に基づく homology-based cloning によって 15 種の PSPG の cDNA (GjUGT1-15) を単離し, それらの組換え酵素を用いて crocetin を基質として, 配糖化活性をスクリーニングした。その結果, GjUGT1 と GjUGT14 に crocetin が配糖化して crocetin monoglucosylester (crocine-5) と crocetin diglucosylester (crocine-4) を順次生成する活性を示した (Fig. 11)。この両者は 474 アミノ酸からなる推定アミノ酸配列において 3 アミノ酸の違いしかなかった。基質特異性を検討したところ, apocarotenoids である bixin に対する活性は示さず, 4-coumaric acid のような phenolic carboxylic acid のカルボキシル基に glucose を抱合する活性は弱いながらも認められたが, フェノール性水酸基に対する配糖化活性は全く認められなかった。⁴³⁾

PSPG のアミノ酸配列と基質特異性の関係については, PSPG cDNA のクローニングが進み, 機能的に同定された PSPG のアミノ酸配列の情報が蓄積されるにつれ, 特に分子系統樹上 (Fig. 12) の位置からある程度の予測が可能になってきた。Crocetin のカルボキシル基を配糖化する酵素として同定された GjUGT1/14 (UGT75L6) は分子系統樹において group D (UGT74 及び UGT75 グループ) に属しているが, このグループの酵素はすべてカル

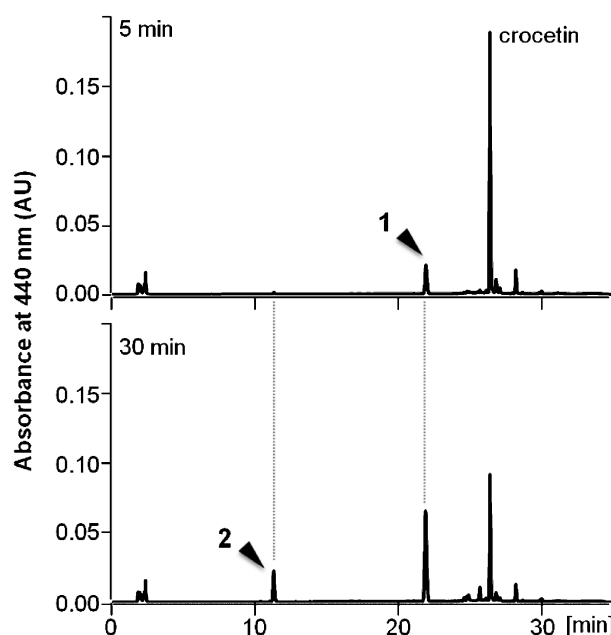


Fig. 11. Glucosylation of Crocetin by GjUGT14 (UGT75L6). Crocetin was incubated with GjUGT14 in the presence of UDP-glucose for 5 min (above) and 30 min (below). 1, crocetin monoglucosylester (crocine-5); 2, crocetin diglucosylester (crocine-4).

ボキシル基の配糖化酵素として機能的に同定されている。配糖体糖鎖に糖を抱合して糖鎖を伸長する活性を持つ PSPG はそれほど多くが知られているわけではないが, それらはすべて分子系統樹において group A (UGT94 グループ) に属していることがわかっていて, そこで, 15 種の PSPG のうち分子系統樹上で group A に属する GjUGT9 及び GjUGT15 に絞って, crocetin glucosylester に対する配糖化活性を検索した。その結果, GjUGT9 (UGT94E5) が crocine-5 から crocine-4 を生じる反応と, crocine-3 から crocine-2 を経て crocine-1 (すなわち crocin) を生じる反応を触媒する酵素活性を示し, crocetin glucosylester 1,6-glucosyltransferase であることがわかった (Fig. 13)。GjUGT9 は, curcumin glucoside に対してわずかに糖鎖伸長活性を示したが, その他の glucoside 類には活性を全く示さなかった。⁴³⁾

Carotenoid 生合成遺伝子を導入することにより *de novo* に xanthophyll を合成・蓄積する大腸菌が創出⁴⁴⁾されており, apocarotenoid 生合成の初発反応である zeaxanthin cleavage dioxygenase がサフランから, 最終の 2 段階の配糖化反応を触媒する PSPG がクチナシから単離できているので, 今後 crocetin dialdehyde dehydrogenase が単離できれ

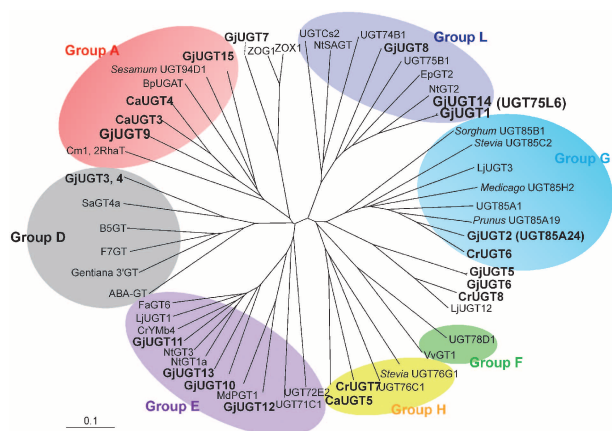


Fig. 12. Un-rooted Molecular Phylogenetic Tree of PSPGs
PSPGs isolated by us are shown in boldface. The tree was constructed by the neighbor-joining method following multiple alignment using the CLUSTALW program. The bar indicates 0.1 amino acid substitution per site.

ば、大腸菌による crocin 及びその関連化合物の生産が可能になるものと期待される。

3-3. 二次代謝糖鎖伸長酵素の構造と機能 植物は多種多様な糖鎖構造を有する低分子配糖体を生産するにもかかわらず、配糖体の糖鎖にさらに糖を抱合して糖鎖を伸長する酵素として単離されたものは、flavanone 配糖体生合成に参与する flavanone 7-*O*-glucoside 1,2-*O*-rhamnosyltransferase⁴⁵⁾ や an-

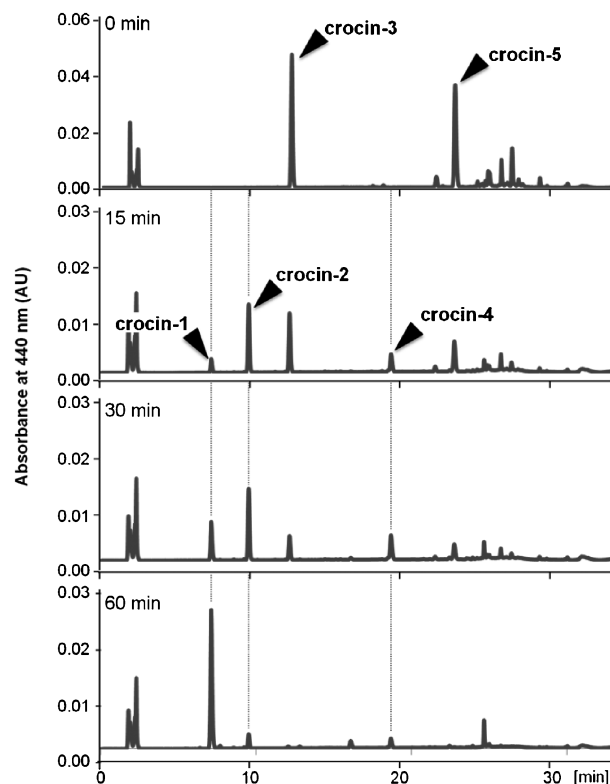


Fig. 13. Glucosylation of Crocetin Glucosyl-esters by GJUGT9 (UGT94E5)

Crocine-3 and crocin-5 were prepared by incubating crocetin and UDP-glucose with GJUGT14.

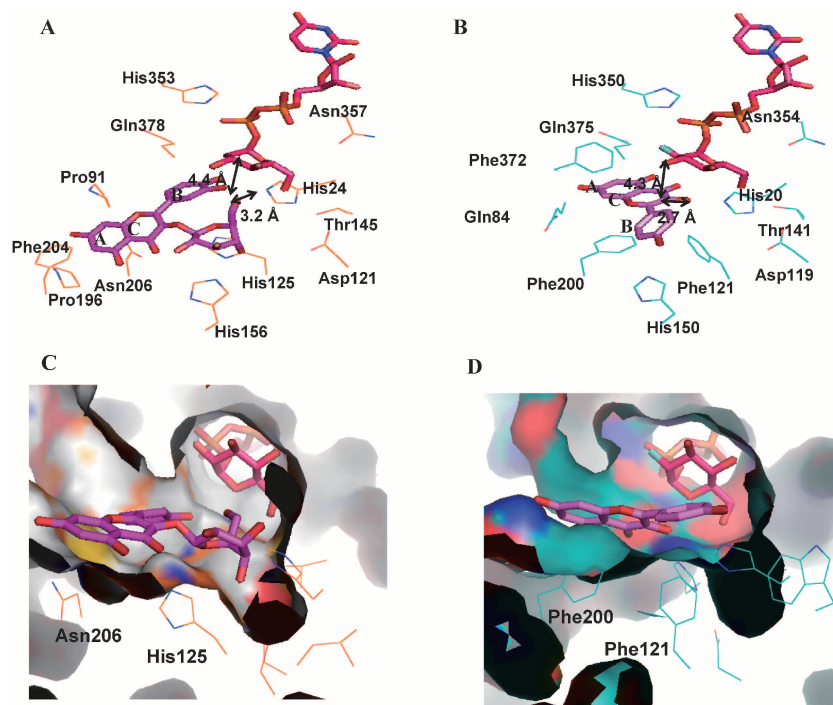


Fig. 14. 3D Structures of CaUGT3 and VvGT1

Sugar donor and acceptor positions in the active centers of CaUGT3 (A) and VvGT1 (B), and substrate-binding pockets of CaUGT3 (C) and VvGT1 (D) are shown with the ligands shown in stick representation.

Table 3. Kinetic Parameters of the Wild Type and Site-directed Mutants of CaUGT3

Proteins	Kinetic parameters for quercetin 3- <i>O</i> -glucoside		
	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Wild type	0.39	0.224	573 (100) ^a
His125Phe	0.95	0.00102	1.07 (0.187)
Asn206Phe	1.17	0.187	160 (27.9)
His125Phe & Asn206Phe	1.06	0.000683	0.644 (0.112)
His125Asn	0.39	0.0217	55.2 (9.64)
His125Asp	0.94	0.00119	1.26 (0.220)

^a Relative value when k_{cat}/K_m of the wild type enzyme is 100.

thocyanin の生合成に関与する anthocyanidin 3-*O*-glucoside 1,2-*O*-glucuronosyltransferase,⁴⁶⁾ anthocyanidin 3-*O*-glucoside 1,2-*O*-glucosyltransferase,⁴⁷⁾ lignan 生合成に係わる sesaminol 2-*O*-glucoside 1,6-*O*-glucosyltransferase⁴⁸⁾ など少数のものしかなく、その構造と機能、特にアクセプター基質の認識機構については不明な部分が多い。

植物二次代謝糖転移酵素の結晶構造の解析については、2005 年から 2007 年にかけてタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*, マメ科) の flavonoid 3'-*O*-glucosyltransferase⁴⁹⁾ 及び flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase,⁵⁰⁾ ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera*, ブドウ科) の flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase,⁵¹⁾ シロイヌナズナの aniline / phenol *N*- and *O*-glucosyltransferase⁵²⁾ についての報告が相次いでいた。特にブドウの flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (VvGT1) では基質である kaempferol と UDP-glucose アナログとの複合体の結晶構造が明らかにされていたので、糖鎖伸長酵素の立体構造と機能について解析するために、ニチニチソウの培養細胞から単離した CaUGT3 のホモロジーモデルを VvGT1 の結晶構造を鋳型として作製し、quercetin 3-*O*-glucoside と UDP-glucose を基質としたドッキングシミュレーションを行った。¹⁸⁾ VvGT と CaUGT3 のアミノ酸配列の相同性は 17.8% に過ぎないが、Udock は -32.84 kcal/mol, quercetin 3-*O*-glucoside の glucose の 6 位の酸素原子と UDP-glucose の glucose の 1 位の炭素原子の距離は 4.4 Å, アクセプター基質の水酸基の脱プロトン化を担う His24 の ε-N との距離は 3.2 Å と、信頼性の高いモデルが構築できた。基質ポケットの比較では、

VvGT の Phe121 と Phe200 に対応する残基が CaUGT3 では His125 と Asn206 であった (Fig. 14)。そのために CaUGT3 では基質ポケットが拡大しており、アグリコンよりも分子サイズが大きい配糖体をアクセプター基質として収納できるスペースが生じていた。CaUGT3 の His125Phe 及び Asn206Phe 変異体を作製してその活性を調べたところ、いずれの変異体でも触媒効率は減少したが、特に His125Phe 変異体で触媒活性の減少が著しく、His125 が基質ポケットのスペースの確保に重要な役割を果たしていることが明らかになった (Table 3)。これらの知見は、初めて糖鎖伸長酵素の機能について構造化学的にアプローチしたものであり、二次代謝糖鎖伸長酵素の反応機構を考える上での基礎的な知見を与えるものである。

4. 機能性化合物配糖体の糖鎖構造と消化管吸収

Curcumin を始め植物由来の機能性化合物には脂溶性の化合物が多い。Quercetin はそのような化合物の代表的なもので、*in vitro* では様々な生理活性が報告されているが、ヒトにカプセルとして経口投与した場合の生物学的利用能は 1% 以下であることが報告されている。⁵³⁾ これらの化合物を配糖化し水溶性を向上させることは消化管吸収性を上げるための有効な方法であると考えられるが、配糖体の糖鎖構造と消化管吸収性の関係は明らかでなかった。われわれは、酵素合成して作製した各種の quercetin 配糖体 (Fig. 15) をラットに経口投与してその薬物速度論的パラメーターを比較した (Table 4)。各種 quercetin 配糖体を経口投与すると血中には quercetin, isorhamnetin, tamarixetin の形で検出される。難水溶性である quercetin 及び rutin の生物学的利用能はそれぞれ 2%, 0.8% と非常に低くほとんど吸収されていないのに対して、quercetin 3-*O*-β-glucoside (isoquercitrin), isoquercitrin 1,6-*O*-α-glucoside (3-*O*-maltosylquercetin), α-oligoglucosyl-isoquercitrin (enzymatically modified isoquercitrin; EMIQ) の生物学的利用能は、12%, 30%, 35% と、水溶性の増加とともに生物学的利用能が高くなり、化合物の水溶性と経口投与時の消化管吸収性の間には密接な関係があることがわかった。ところが、rutin の配糖化産物である α-monoglucosylrutin や α-oligoglucosylrutin では水溶性が著しく改善されているにもかかわらず、生物学的利用能は 2-4% と、

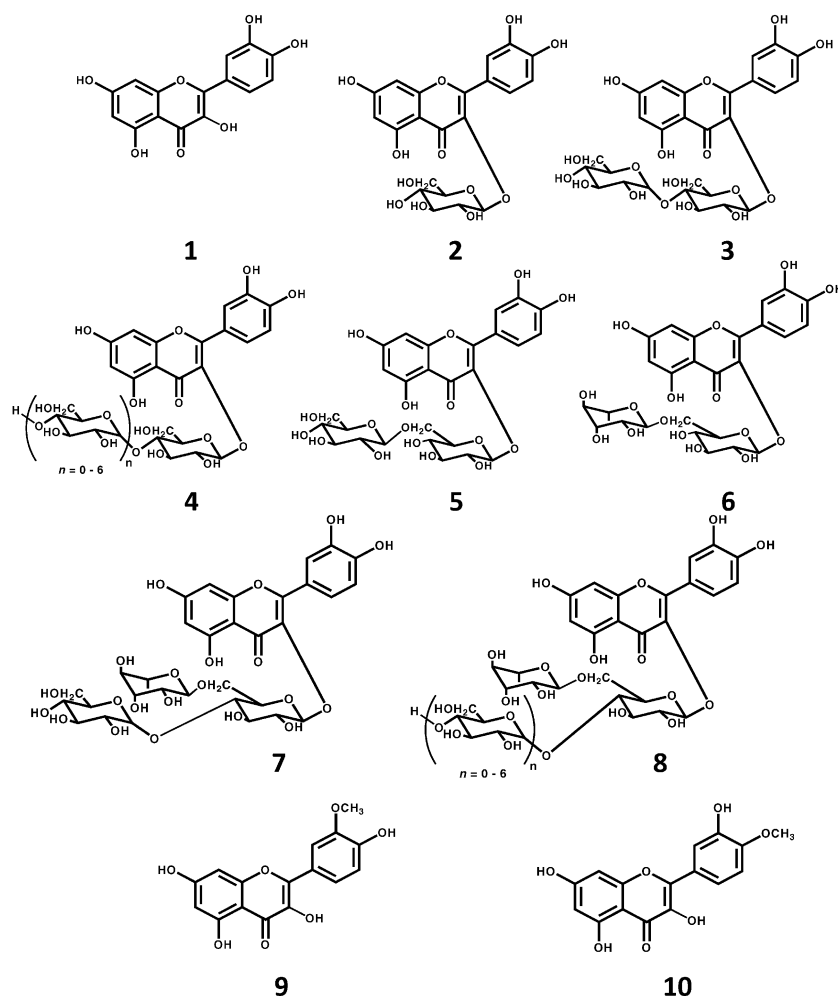


Fig. 15. Chemical Structures of Quercetin Derivatives

Quercetin (1), quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin, IQC, 2), quercetin-3-*O*-maltoside (Q3M, 3), enzymatically modified isoquercitrin (EMIQ, 4), quercetin-3-*O*-gentiobioside (Q3G, 5), rutin (6), α -monoglucosyl rutin (α MR, 7), α -oligoglucosyl rutin (α OR, 8), isorhamnetin (9), and tamarixetin (10).

Table 4. Pharmacokinetic Parameters of Quercetin and Its Metabolites after Oral Administration of Several Flavonoid Glycosides in Rats

	Quercetin			Isorhamnetin	Tamarixetin
	$C_{\max}$ (μM)	$\text{AUC}_{0-12\text{ h}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	F value (%)	$\text{AUC}_{0-12\text{ h}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	$\text{AUC}_{0-12\text{ h}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)
EMIQ	10.7 ± 1.5^a	46.0 ± 7.0^a	35.0 ± 5.3^a	55.1 ± 11.3^a	$11.2 \pm 2.4^{a,c,d}$
IQC	2.66 ± 0.81^b	15.8 ± 3.6^b	12.1 ± 2.8^b	13.8 ± 4.6^b	$6.70 \pm 2.81^{a,b,c,d}$
quercetin	0.26 ± 0.06^b	2.6 ± 0.7^b	2.0 ± 0.5^b	1.50 ± 4.59^b	$0.89 \pm 0.23^{b,d}$
Q3M	8.36 ± 1.30^a	39.4 ± 4.8^a	30.0 ± 3.7^a	42.9 ± 0.1^a	$8.51 \pm 1.60^{a,c}$
Q3G	0.91 ± 0.62^b	3.9 ± 1.6^b	3.0 ± 1.2^b	0.91 ± 0.13^b	$1.19 \pm 0.33^{b,d}$
rutin	0.11 ± 0.02^b	1.0 ± 0.4^b	0.8 ± 0.3^b	0.79 ± 0.61^b	$0.60 \pm 0.30^{b,d}$
α MR	1.87 ± 0.76^b	5.3 ± 1.3^b	4.1 ± 1.0^b	3.10 ± 0.97^b	$2.10 \pm 0.61^{b,c,d}$
α OR	0.69 ± 0.21^b	2.4 ± 0.4^b	1.8 ± 0.3^b	1.25 ± 0.28^b	$0.72 \pm 0.20^{b,d}$

Each quercetin glycoside was dissolved or suspended in H_2O (5 mM), and administered to rats at the dosage of 50 $\mu\text{mol/kg}$. Plasma samples were treated with β -glucuronidase/sulfatase, and the concentrations of quercetin and its metabolites were measured. The $\text{AUC}_{0-12\text{ h}}$ values were calculated by the trapezoid rule, and F values were calculated as the ratios of AUC to the mean of $\text{AUC}_{0-12\text{ h}}$ values when quercetin dissolved in DMSO was injected into the vein ($131 \pm 6 \mu\text{M}\cdot\text{h}$, $n=5$). Data were expressed as mean $\pm$ S.E. ($n=6-7$). a-d) Values with different letters are significantly different at the levels of $p < 0.05$ by Bonferroni/Dunn multiple comparison tests.

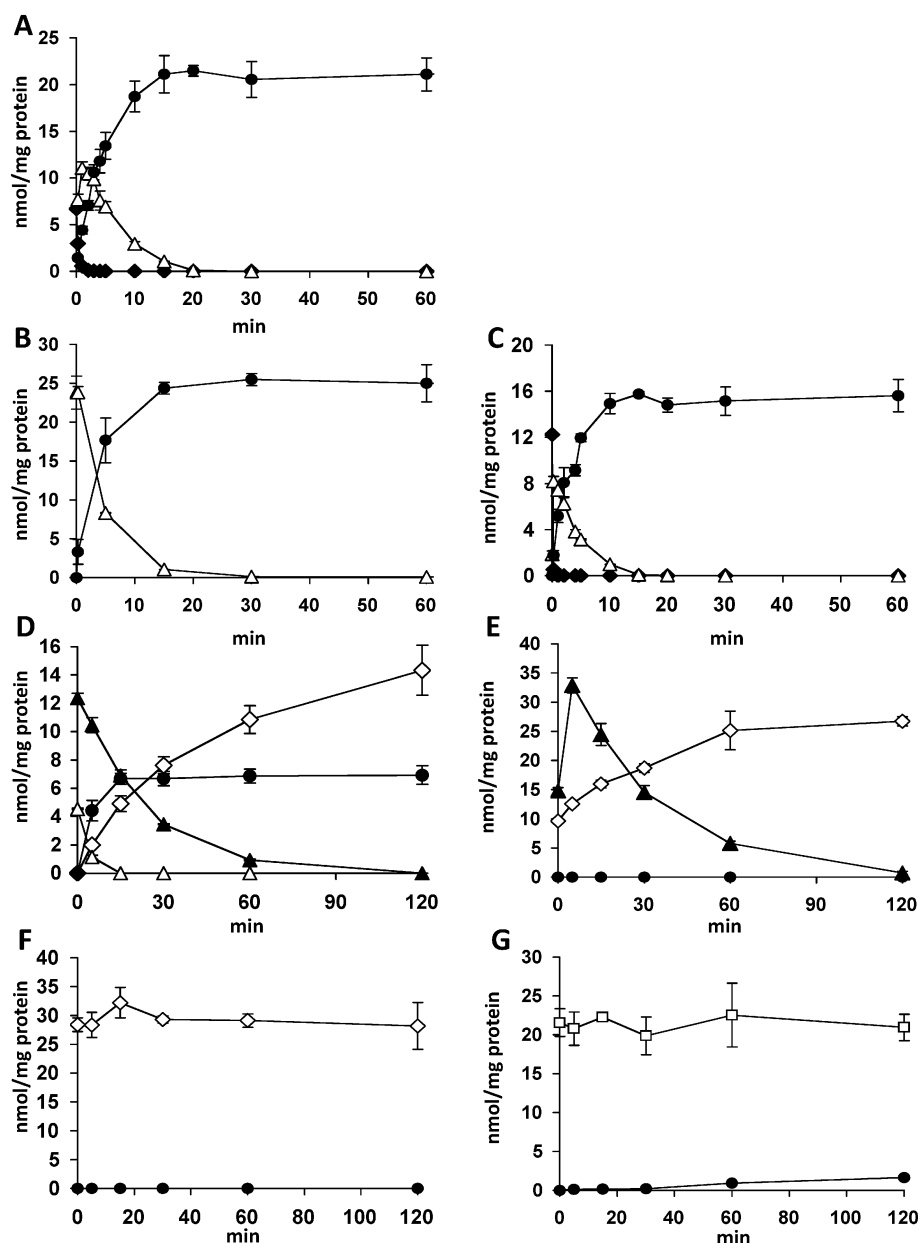


Fig. 16. Hydrolysis of EMIQ (A), IQC (B), Q3M (C), α MR (D) and α OR (E), rutin (F), Q3G (G) by the Homogenate of Rat Intestinal Epithelium

Each sample was incubated with the homogenate at 37°C, and the concentrations of quercetin (closed circles), IQC (open triangles), Q3M (closed diamonds), Q3G (opensquares), rutin (open diamonds) and α MR (closed triangles) in the reactant were measured. The data were calibrated by the concentration of proteins in the reactant, and expressed as mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

消化管吸収性は rutin と比較してほとんど変化しなかった。また、isoquercetin 1,6- O - β -glucoside と quercetin 7,3'- O - β -diglucoside では、どちらも quercetin に 2 分子の glucose を抱合した配糖体で水溶性も同程度に増加しているにもかかわらず、後者は EMIQ と同程度の消化管吸収性を示すが、前者はほとんど吸収されなかった。

ラットの小腸上皮組織から調製した粗酵素液を用いてこれらの化合物を加水分解すると 3- O -malt-

osylquercetin と EMIQ は速やかに isoquercitrin を経て quercetin まで分解されるが、 α -monoglucosyl-rutin と α -oligoglucosylrutin では rutin を速やかに生じるが、quercetin まで分解されなかった。また、quercetin 7,3'- O - β -diglucoside は急速に quercetin にまで分解されたが、isoquercitrin 1,6- O - β -glucoside の分解は極めて緩やかであった (Fig. 16)。これらのことから、quercetin 配糖体の消化管吸収には、小腸粘膜上皮の存在する α -glucosidase

活性や β -glucosidase 活性を有する酵素によって quercetin まで加水分解されることが必要であることがわかった。^{54,55)}

これらの結果は、配糖化による水溶性の向上は機能性化合物の消化管吸収を向上させる有力な方法であるが、消化管上皮に存在する glucosidase 類によって認識されアグリコンにまで分解され得る糖鎖構造を構築することが重要であることを示している。

5. おわりに

高等植物の PSPG は、植物二次代謝産物の構造多様性を形成する上で重要な役割を果たしている。これらの酵素は、二次代謝中間産物の細胞内における、あるいは細胞間における輸送、生合成最終産物の貯蔵などにおいて重要な役割を果たしているだけでなく、外来異物の液胞への排泄という形での生体防御にも関与しているものと考えられる。これらの酵素は有機化合物の糖鎖構築のための生触媒としても有用性が高い。PSPG の機能の多様性を反映して、植物のゲノムには極めて多数の PSPG の遺伝子が存在している。基礎的な観点からも配糖体合成という応用的な観点からも、植物ゲノムの鉱脈から多彩な PSPG を発掘し、機能的に同定することが望まれる。次世代シーケンサーの普及に伴い、多数の有用植物について全ゲノム情報の解読が進み、Expressed Sequence Tags (EST) データベースの構築も進んでいる。これらの情報を活用して、PSPG の多様性の全貌の解明が進むものと期待している。

謝辞 本研究の遂行に協力を頂いた、名古屋市立大学大学院薬学研究科牧野利明教授、寺坂和祥講師を始め、すべての共同研究者の方々に御礼を申し上げます。本研究の一部は、JSPS 科研費 (14572008, 22590009, 25460127) の助成を得て実施した。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Schwab W., *Phytochemistry*, **62**, 837–849 (2003).
- 2) Milbury P. E., *Methods Enzymol.*, **335**, 15–26 (2002).
- 3) Carbohydrate-active enzymes (CAZY): <http://www.cazy.org/Glycosyltransferases.html>, cited 5 April, 2015.

- 4) Jones P., Vogt T., *Planta*, **213**, 164–174 (2001).
- 5) Křen V., Thiem J., *Chem. Soc. Rev.*, **26**, 463–473 (1997).
- 6) Lim E. K., *Chem. Eur. J.*, **11**, 5486–5494 (2005).
- 7) Takahashi R., Odera K., *Yakugaku Zasshi*, **135**, 33–40 (2015).
- 8) Shanmugam M. K., Rane G., Kanchi M. M., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M. E., Alharbi S. A., Tan B. K., Kumar A. P., Sethi G., *Molecules*, **20**, 2728–2769 (2015).
- 9) Chin D., Huebbe P., Pallauf K., Rimbach G., *Curr. Med. Chem.*, **20**, 3955–3985 (2013).
- 10) Sasaki H., Sunagawa Y., Takahashi K., Imaizumi A., Fukuda H., Hashimoto T., Wada H., Katanasaka Y., Kakeya H., Fujita M., Hasegawa K., Morimoto T., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 660–665 (2011).
- 11) Pilgrim H., *Pharmazie*, **25**, 568 (1970).
- 12) Inomata S., Yokomine M., Seto Y., Yanagi M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 315–319 (1991).
- 13) Kometani T., Tanimoto H., Nishimura T., Okada S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1290–1293 (1993).
- 14) Shimoda K., Kwon S., Utsuki A., Ohiwa S., Katsuragi H., Yonemoto N., Hamada H., Hamada H., *Phytochemistry*, **68**, 1391–1396 (2007).
- 15) Kaminaga Y., Nagatsu A., Akiyama T., Sugimoto N., Yamazaki T., Maitani T., Mizukami H., *FEBS Lett.*, **555**, 311–316 (2003).
- 16) Hughes J., Hughes M. A., *DNA Seq.*, **5**, 41–49 (1994).
- 17) Kaminaga Y., Sahin F. P., Mizukami H., *FEBS Lett.*, **567**, 197–202 (2004).
- 18) Masada S., Terasaka K., Oguchi Y., Okazaki S., Mizushima T., Mizukami H., *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1401–1415 (2009).
- 19) Mackenzie P. I., Owens I. S., Burchell B., Bock K. W., Bairoch A., Bélanger A., Fournel-Gigleux S., Green M., Hum D. W., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J. R., Ritter J. K., Schachter H., Tephly T. R., Tipton K. F., Nebert D. W.,

- Pharmacogenetics*, **7**, 255–269 (1997).
- 20) Hergenhausen M., German Patent Application, DE2337 (2002).
- 21) Mohri K., Watanabe Y., Yoshida Y., Satoh M., Isobe K., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 1268–1272 (2003).
- 22) Ichikawa Y., Wang R., Wong C. H., *Methods Enzymol.*, **247**, 107–127 (1994).
- 23) Bülter T., Elling L., *Glycoconj J.*, **16**, 147–159 (1999).
- 24) Koch K., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 235–246 (2004).
- 25) Masada S., Kawase Y., Nagatoshi M., Oguchi Y., Terasaka K., Mizukami H., *FEBS Lett.*, **581**, 2562–2566 (2007).
- 26) Chopra S., Del-favero J., Dolferus R., Jacobs M., *Plant Mol. Biol.*, **18**, 131–134 (1992).
- 27) Lim E. K., Ashford D. A., Hou B., Jackson R. G., Bowles D. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 623–631 (2004).
- 28) Terasaka K., Mizutani Y., Nagatsu A., Mizukami H., *FEBS Lett.*, **586**, 4344–4350 (2012).
- 29) Bowers M. D., “Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Vol. I, The Chemical Participants,” 2nd ed., ed. by Rosenthal G. A., Berenbaum M. R., Academic Press, New York, 1992, pp. 297–325.
- 30) Tundis R., Loizzo M. R., Menichini F., Statti G. A., Menichini F., *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 399–420 (2008).
- 31) Oudin A., Courtois M., Rideau M., Clastre M., *Phytochem. Rev.*, **6**, 259–276 (2007).
- 32) Yamazaki Y., Kitajima M., Arita M., Takayama H., Sudo H., Yamazaki M., Aimi N., Saito K., *Plant Physiol.*, **134**, 161–170 (2004).
- 33) Contin A., van der Heijden R., Lefeber A. W., Verpoorte R., *FEBS Lett.*, **434**, 413–416 (1998).
- 34) Obied H. K., Prenzler P. D., Ryan D., Servili M., Taticchi A., Esposto S., Robards K., *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 1167–1179 (2008).
- 35) De Luca V., Salim V., Levac D., Atsumi S. M., Yu F., *Methods Enzymol.*, **515**, 207–229 (2012).
- 36) Liscombe D. K., O’Connor S. E., *Phytochemistry*, **72**, 1969–1977 (2011).
- 37) Asada K., Salim V., Masada-Atsumi S., Edmunds E., Nagatoshi M., Terasaka K., Mizukami H., De Luca V., *Plant Cell*, **25**, 4123–4134 (2013).
- 38) Nagatoshi M., Terasaka K., Nagatsu A., Mizukami H., *J. Biol. Chem.*, **286**, 32866–32874 (2011).
- 39) Murata J., Roepke J., Gordon H., De Luca V., *Plant Cell*, **20**, 524–542 (2008).
- 40) Ochiai T., Shimeno H., Mishima K., Iwasaki K., Fujiwara M., Tanaka H., Shoyama Y., Toda A., Eyanagi R., Soeda S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 578–584 (2007).
- 41) Pfander H., Schultenberger H., *Phytochemistry*, **21**, 1039–1042 (1982).
- 42) Frusciante S., Dretto G., Brunoc M., Fer-rantea P., Pietrellaa M., Prado-Cabrerod A., Rubio-Moragae A., Beyerc P., Gomez-Gomeze L., Al-Babili S., Giulianoa G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12246–12251 (2014).
- 43) Nagatoshi M., Terasaka K., Owaki M., Sota M., Inukai T., Nagatsu A., Mizukami H., *FEBS Lett.*, **586**, 1055–1061 (2012).
- 44) Misawa N., Satomi Y., Kondo K., Yokoyama A., Kajiwaras S., Saito T., Ohtani T., Miki W., *J. Bacteriol.*, **177**, 6575–6584 (1995).
- 45) Frydman A., Weissshaus O., Bar-Peled M., Huhman D. V., Sumner L. W., Marin F. R., Lewinsohn E., Fluhr R., Gressel J., Eyal Y., *Plant J.*, **40**, 88–100 (2004).
- 46) Sawada S., Suzuki H., Ichimaida F., Yamaguchi M. A., Iwashita T., Fukui Y., Hemmi H., Nishino T., Nakayama T., *J. Biol. Chem.*, **280**, 899–906 (2005).
- 47) Morita Y., Hoshino A., Kikuchi Y., Okuhara H., Ono E., Tanaka Y., Fukui Y., Saito N., Nitasaka E., Noguchi H., Iida S., *Plant J.*, **42**, 353–363 (2005).
- 48) Noguchi A., Fukui Y., Iuchi-Okada A., Kakutani S., Satake H., Iwashita T., Nakao M., Umezawa T., Ono E., *Plant J.*, **54**, 415–427 (2008).
- 49) Shao H., He X., Achnine L., Blount J. W., Dixon R. A., Wang X., *Plant Cell*, **17**, 3141–3154 (2005).
- 50) Li L., Modolo L. V., Escamilla-Trevino L. L., Achnine L., Dixon R. A., Wang X., *J. Mol. Biol.*, **370**, 951–963 (2007).
- 51) Offen W., Martinez-Fleites C., Yang M., Kiat-Lim E., Davis B. G., Tarling C. A., Ford C.

- M., Bowles D. J., Davies G. J., *EMBO J.*, **25**, 1396–1405 (2006).
- 52) Brazier-Hicks M., Offen W. A., Gershater M. C., Revett T. J., Lim E. K., Bowles D. J., Davies G. J., Edwards R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20238–20243 (2007).
- 53) Gugler R., Leschik M., Dengler H. J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **9**, 229–234 (1975).
- 54) Makino T., Shimizu R., Kanemaru M., Suzuki Y., Moriwaki M., Mizukami H., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 2034–2040 (2009).
- 55) Makino T., Kanemaru M., Okuyama S., Shimizu R., Tanaka H., Mizukami H., *J. Nat. Med.*, **67**, 881–886 (2013).